

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12672

研究課題名(和文) 妊娠マウスの深部体温変動を再現して体外受精卵の発育促進を目指す

研究課題名(英文) Promote IVF embryo development by reproducing deep body temperature fluctuations in pregnant mice.

研究代表者

村山 嘉延 (MURAYAMA, Yoshinobu)

日本大学・工学部・准教授

研究者番号：80339267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠した雌マウスでは明期(休息中)の体温が0.6℃上昇するとともに概日リズムが大きく減少し、不規則変動成分ではばらつきが減少するが逆に複雑性が増加する結果を得た。成人女性においても就寝時の腹部皮膚温のゆらぎ変化から卵胞期、排卵期、黄体期を判別できることが分かった。加えて、腹部皮膚温の最高値を指標とすることで従来の舌下温測定と同等の基礎体温表が描けることが分かった。最後に、受精卵培養に24時間周期のゆらぎを与えたところ、形態学的品質が「良い」および「普通」に分類される胚が1.8倍ほど増加し、「悪い」に分類される胚が減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト生殖補助医療では、卵子は受精後の数日間を37℃一定の人工的な体外培養環境で発育した後に母胎に移植される。一方で、受精卵本来の培養環境である母親の深部体温はゆらいであり、この体温変動を模倣することでより卵子に優しい培養環境を提供できる可能性がある。しかし、これまでに女性の体内深部温度のゆらぎが詳細に調べられたことは無かった。妊娠した雌マウスにのみ確認できた体温変動は、胚盤胞がまだ子宮に着床していない受精後5日以内に妊娠を判別できる可能性を示す。さらに、ゆらぎのある体外培養温度は受精卵品質を向上させる可能性が示されたことから、体外受精におけるさらなる着床率向上に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In pregnant female mice, a 0.6℃ increase in body temperature during the light phase (resting) significantly decreased the circadian rhythm. The random fluctuation component increased in complexity while variability decreased. In adult women, fluctuating changes in abdominal skin temperature at bedtime can be used to determine the follicular, ovulatory, and luteal phases of the cycle. Furthermore, the highest abdominal skin temperature reading can be used as an indicator to draw a basal body temperature chart equivalent to the conventional sublingual temperature measurement. Finally, when the embryo was subjected to a culture condition with 24-hour fluctuation cycle, the number of embryos classified as GOOD and FAIR in morphological quality increased 1.8-fold, while the number of embryos classified as POOR decreased.

研究分野：生体医工学

キーワード：受精卵 培養温度 体温 ゆらぎ 月経 基礎体温

1. 研究開始当初の背景

本邦の少子化の進行は深刻さを増しており、出生率の低下に歯止めをかけるためには、ヒト生殖補助医療(不妊治療)への公的支援を含めた対策を講じて出生回復させることが重要と考えられている。しかしながら、ヒト生殖補助医療もまだ完璧な治療法であるとは言い難く、とくに「受精から移植までの初期受精卵発育を体外の人工的な環境で培養し、ふたたび体内に戻す」ところに技術的に克服すべき難題がある。たとえば、新鮮胚(卵)を用いた治療成績では、人工授精に成功し移植に至るまでに37.9%、移植後の妊娠率が22.6%、総じて採卵あたりの妊娠率は8.6%と低い数字が報告されている(日本産科婦人科学会, 倫理委員会 登録・調査小委員会報告, 2014年)。

本来、受精した卵子は母胎(卵管から子宮にかけて)で発育する。一方でヒト生殖補助医療では、卵子は受精後の数日間を体外培養環境で発育した後に母胎に移植される。体外培養の温度環境は世界的に同じく37℃一定であり、培養温度が変化してストレスを与えてはいけないとされているが、それでもなお母胎における受精卵の発育に比べると劣り、採卵あたりの妊娠率が低い原因となっている。37℃一定が最も良い培養環境であろうか?

そもそも、ヒトの平均的な深部体温(下腹部)は37℃よりわずかに高く、概日周期、生理周期と共に周期的に変化している。さらには、肝心となる妊娠超初期(受精後~5日程度)の深部体温の変動を詳細に調べた研究は申請者の知る限り存在しない。このような背景から既存には無い視点で本研究を着想するに至った。本研究では「受精卵本来の発育環境にみられる温度変動を模倣した方が、発育度が良いはずである」という仮説(問い)を立て、その解明を試みる。

2. 研究の目的

本研究では、まず母胎の深部体温変動を詳細に調べ、次いで母胎を模倣して培養器内の温度を変動させながら受精卵を培養し、発育の様子(受精卵品質)を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

【計画1】

自然交配させた妊娠マウスの深部体温変動を5日間連続測定して、受精後早期(0日~5日)の妊娠マウスの深部体温変動を測定する。測定した深部体温変動から、体温変動の特徴量を抽出するとともに、交配と受精による体温変動について調べ、超早期における妊娠判定の可能性について調べる。

【計画2】

深部体温変動の特徴パターンに対して ± 0.01 ℃以内に追従できる培養器を開発する。開発した培養器をのせる顕微鏡にも、さらに工夫して受精卵を連続タイムラプス観察するためのシステムを開発する。

【計画3】

妊娠マウスから採取した受精直後の2細胞期受精卵を、計画2で開発した「深部体温変動を模倣する培養環境」で培養し、胚盤胞到達度、形態学的胚グレードを調べて胚の発育率を調べる。

【計画4】

正常な月経周期を繰り返す女性の腹部皮膚温を連続測定(就寝時)し、月経後の卵胞期、排卵期、黄体期における体温変動のゆらぎに見られる特徴量の変化について調べる。計画4は当初の実験計画には含まれていないが、研究を進めるなかで、女性のお腹の温度を数分間隔で連続的に調べられたことがないと分かり、付け加えて研究を実施することとした。

4. 研究成果

【結果1】

マウス飼育室を正常な明暗周期に設定して実験を行った。すなわち、部屋が明るくマウスが休眠状態にある時間を12時間、部屋が暗くマウスが活動状態にある時間を12時間に設定した。この飼育室において雌雄マウスを交配させ、受精(交配)前後の5日間における雌マウスの体温変動を調べたところ、妊娠した全てのマウスでは交配により明期の体温が0.6℃上昇(交配前36.97℃, 交配後37.52℃)したが、非妊娠群では体温上昇はみられなかった。交配前後における明期と暗期の平均体温は、妊娠群では全てのマウスで温度差が減少(交配前0.74℃, 交配後0.27℃)したのに対し、非妊娠群では僅かに上昇(交配前0.74℃, 交配後0.88℃)した。これにともない

概日リズムが鈍くなり、6時間周期をのぞくほぼ全ての周期変動成分が減少していることが分かった。加えて、妊娠が確認できた全ての個体で不規則変動成分のばらつきが減少し (-0.07 ± 0.04 , $n=8$), サンプルエントロピーが上昇した ($+0.353$)。一方、非妊娠群ではばらつきの変化に有意差が得られないものの、全ての個体でサンプルエントロピーが減少した。妊娠が確認できたマウスにのみ表れる体温変動の変化が確認できたことから、胚盤胞がまだ子宮に着床していない受精後5日以内に妊娠を判別できる可能性が見出されたと言える。

【結果2】

一定温度に制御した空気を保温ホースを通して吹き出し口から倒立型顕微鏡ステージ全体に吹き付けることで培養チャンバー全体の温度を制御する装置を開発し、0.1 の分解能で培養温度を制御できる顕微鏡タイムラプス観察装置を開発した。

【結果3】

マウス受精卵を用いて体外培養温度に変動を与える実験を行い本研究の仮説を検証した。37 一定の培養環境を対照群として、12 時間毎に 37 /38.5 の変化を与えた実験群との胚盤胞品質（形態学的品質）を比較した結果、GOOD および FAIR に分類される胚が 1.8 倍ほど増加し、POOR に分類される胚が減少した。ゆらぎのある体外培養温度は受精卵品質を向上させる可能性が示された。

【結果4】

さらに、本研究を通して時間分解能の高い体温の時系列データ解析を試みたところ、月経排卵周期に関する以下の知見を得た。

（実験1）45人の健康な女性から得られた202周期を対象として、就寝時腹部皮膚体温と舌下温とを用いた体温移行日の検出精度について比較した。検出感度の割合は、舌下温と腹部皮膚体温でそれぞれ85.9%、80.1%、LH陽性日からのずれは、舌下温で 0.3 ± 2.5 日、腹部皮膚体温で 0.4 ± 2.5 日であり、両者に有意な差は認められなかった。同一周期に対応する両者の差には強い相関（決定係数0.703）が得られ、腹部皮膚温度を使用して舌下温度と同等の精度で排卵日が推定できる可能性が示された。就寝中における連続的な腹部皮膚温（AST）の測定が、女性の月経と排卵に伴う2相性の基礎体温（BBT）リズムの検出において従来の舌下温によるBBT測定の代替となり得ることを確認した。（引用文献1）

（実験2）7人の健康な女性から得られた月経・卵胞期、排卵期、黄体期それぞれ1667日、1035日、1690日において、就寝時腹部皮膚体温にみられる10分ごとの累積確率分布を評価したところ、月経・卵胞期に最も高い減衰係数8.57を示し、排卵期7.80、黄体期7.24と進むにつれて値が低くなることが分かった。起床時に口中内で計測される基礎体温に加えて、就寝時の腹部皮膚温（AST）のゆらぎ変化からも月経と排卵にともなう体温の2相性が検出できることが示された。（引用文献2）

今後、さらに詳細に培養温度と受精卵発育との関係について調べ、自然な状態の母親マウスの体温変動が受精卵発育に与える影響について遺伝子や蛋白発現をもとに調べる予定である。

<引用文献>

1. Yoshinobu Murayama, Aiko Uemura, Masumi Kitazawa, Jun Toyotani, Asako Taniuchi and Tatsuo Togawa "Determination of biphasic menstrual cycle based on the fluctuation of abdominal skin temperature during sleep." Advanced Biomedical Engineering, vol.12, pp.28-36, 2023, doi.org/10.14326/abe.12.28
2. Yoshinobu Murayama, Masumi Kitazawa, Hiraku Sato and Aiko Uemura "The accuracy of abdominal skin temperature in detecting ovulation compared to basal body temperature." Japanese Journal of Applied IT Healthcare, vol17, Issue suppl 2, pp.6-9, 2022, doi: 10.11204/ithc.17.s2_6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshinobu Murayama, Aiko Uemura, Masumi Kitazawa, Jun Toyotani, Asako Taniuchi and Tatsuo Togawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Determination of biphasic menstrual cycle based on the fluctuation of abdominal skin temperature during sleep	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 28-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14326/abe.12.28	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshinobu Murayama, Masumi Kitazawa, Hiraku Sato and Aiko Uemura	4. 巻 17
2. 論文標題 The accuracy of abdominal skin temperature in detecting ovulation compared to basal body temperature.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied IT Healthcare	6. 最初と最後の頁 6-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11204/ithc.17.s2_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村山嘉延
2. 発表標題 受精卵の品質を保ち、定量的に評価する医工学
3. 学会等名 第63回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石田愛乃, 村山嘉延
2. 発表標題 マウス受精卵の培養温度に12時間変動を与えた場合の胚発育への影響
3. 学会等名 第63回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 石田愛乃、村山嘉延
2. 発表標題 培養温度の12時間変動が胚発育に及ぼす影響
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤光、村山嘉延
2. 発表標題 熱抵抗比を用いたウェアラブル腹部温度計の温度特性
3. 学会等名 電子情報通信学会総合大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yoshinobu Murayama, Hikaru Sato, Hiroto Igari
2. 発表標題 Abdominal skin temperature measurements taken during sleep as a simpler alternative to monitor basal body temperature rhythm
3. 学会等名 IEEE-EMBS International Conference on Biomedical and Health Informatics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村山嘉延、佐藤光、猪狩裕斗
2. 発表標題 就寝時腹部皮膚温を指標とした基礎体温表の有用性
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村山嘉延、北沢眞澄、佐藤光、植村あい子
2. 発表標題 就寝時腹部皮膚体温を用いた排卵日予測
3. 学会等名 ITヘルスケア学会 第15回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部友紀、佐藤光、村山嘉延
2. 発表標題 交尾により雌マウス深部体温に生じる不規則変動成分の変化
3. 学会等名 日本生体医工学シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村山嘉延、植村あい子、北沢眞澄、豊谷純、谷内麻子、戸川達男
2. 発表標題 Determination of biphasic menstrual cycle based on the fluctuation of abdominal skin temperature during sleep.
3. 学会等名 日本生体医工学シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ミシガン大学			